

Modellversuche zur Frage einer immunologischen Wachstumshehmung maligner Tumoren

von

Gundolf Käfer

aus

Leipzig

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan :..... Prof. Dr. L. Demling
Referent:..... Prof. Dr. F. Scheiffarth
Tag der mündlichen Prüfung:... 29. April 1974

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

A) <u>Einleitung</u>	1
B) <u>Hauptteil</u>	4 - 18
Untersuchungsgut, Versuchsanordnung und Methodik.....	4
1. Untersuchungsgut.....	4
2. Versuchsanordnung.....	4
3. Methodik.....	7
a) Blutentnahme.....	7
b) CAF-Elektrophorese.....	7
c) Gewinnung des Tumorzellfiltrats.....	8
d) Gewinnung des Tumorphomogenats.....	9
e) BDB-Technik.....	9
f) Gewinnung des Milzzellfiltrats.....	12
g) Transplantationstechnik.....	12
h) Operationstechnik.....	12
i) Sensibilierungsplan.....	13
k) Immundoppeldiffusion (Ouchterlony).....	13
l) Histologische Praeparationen.....	18
C) <u>Ergebnisse</u>	19 - 24a
1. Beobachtung an den Tieren.....	19
2. Ergebnisse der CAF-Elektrophoresen.....	22
3. Ergebnisse der Immundiffusion.....	24
4. Histomorphologische Befunde.....	24a
D) <u>Diskussion</u>	25 - 30
E) <u>Zusammenfassung</u>	31 - 32
F) <u>Literaturverzeichnis</u>	33 - 41

A) E i n l e i t u n g

Die moderne Immunonkologie hat erwiesen, daß Neoplasien - ungeachtet ihrer geweblichen Herkunft und ungeachtet des sie verursachenden Faktors - in einem Wirtsorganismus Sensibilisierungsvorgänge zu induzieren vermögen. Während chemisch induzierte und durch Viren induzierbare Tumoren im Tierexperiment eine echte tumorspezifische Immunreaktion des Wirtsorganismus im Sinne der Transplantationsreaktion erkennen lassen (3, 8-10, 14-19, 21, 23, 24, 27, 28, 33-37, 39-44, 48, 50, 51, 54, 57-59, 61-63, 65), sind die immunologischen Auseinandersetzungen zwischen tumortragendem Organismus und Tumorzellfaktoren für die in der Humanpathologie gegebene Situation der sog. Spontantumoren noch nicht eindeutig erwiesen. Zwar sind beim Menschen Anhaltspunkte dafür vorhanden, daß spezifische Tumorantigene existieren (4-6, 8, 11-13, 22, 25, 26, 29, 30-32, 38, 45, 53, 55, 56, 64, 66, 67, 68), doch scheinen die Abwehrmechanismen nicht auszureichen, um das unkontrollierte Tumorwachstum zu verhindern. Das mag damit zusammenhängen, daß das Antigen von menschlichen Spontantumoren zu "schwach" ist, um eine für die Transplantatabstoßung und somit für die Tumorabstoßung ausreichende Antikörperbildung

zu induzieren. Oder aber es besteht eine Diskrepanz zwischen dem durch die gesteigerte Mitoserate bedingten Antigenangebot - also Tumorzellen - und den allmählich sich entwickelnden spezifischen zellvermittelten Antikörpern. Das Antigenüberangebot ist bei Tumoren in jedem Fall gegeben, da vom Moment der Tumorentwicklung an bis zur Entwicklung spezifischer Cloni mit der Fähigkeit, Tumorantikörper zu produzieren, eine Latenzzeit von mindestens 8 Tagen verstreicht, in der sich jedoch das Tumormaterial, kraft seiner erhöhten Zellteilungsfähigkeit um ein vielfaches vermehrt hat. Hinzu kommt, daß in den Fällen, in denen eine Frühdiagnose des Tumors gestellt werden konnte, eine zumeist intensive cytostatische Therapie im Gange ist, die es mit sich bringt, daß auch das immunkompetente System in seiner Funktion gehemmt wird.

Ein weiteres Problem ergibt sich durch die Tatsache, daß molekulare Antikörper gegenüber Tumorzelloberflächenfaktoren befähigt sind, diese Tumormembranantigene zu blockieren. Daraus resultiert einerseits, daß das antigene Stimulans zur Antikörperbildung in seiner immunologischen Funktion gehemmt wird; andererseits, daß bereits vorhandene zellvermittelte Antikörper mit den Tumorzellfaktoren nicht zu reagieren vermögen. Die Tumorzellen sind also in der Lage, ungehindert weiterzuwachsen.

Schließlich können lösliche Tumorantigene die Rezeptoren (Antigenbindungsstellen der Fab-Bereiche membranin-

korporierter Immunglobuline) der spezifisch sensibilisierten Lymphozyten besetzen und eine immunologische Auseinandersetzung dieser Lymphozyten mit ihren "Zielzellen" unterbinden.

Somit ergibt sich für eine große Zahl spontan entwickelter Tumoren die Situation, daß Tumorzellen erneut antigen gemacht werden müssen, damit sie vom tumortragenden Organismus wieder als "fremd" erkannt und durch spezifische Aktivierung seines immunkompetenten Systems attackiert werden können. Das gilt auch für die Fälle, bei welchen ein "schwaches" tumorspezifisches Antigen nachgewiesen oder vermutet werden darf.

In vorliegender Versuchsreihe sollte am Beispiel Walker-Carcinom-tragender Ratten der Versuch demonstriert werden, Tumorzellen durch xenologes Transferrin zu maskieren und auf diese Weise dem Organismus für eine spezifische zelluläre Antikörperbildung anzubieten.

B) Hauptteil

Untersuchungsgut, Versuchsanordnung und Methodik

1. Untersuchungsgut

Es wurden insgesamt 87 Albinoratten (Wistar)¹ beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 200 g in Versuch genommen. 48 Tiere dienten als Hauptversuchsgruppe, 31 als Kontrollgruppe. 8 Ratten wurden für einen Nachversuch vorbehalten.

Als rattentransplantabler Tumor wurde WALKER-Carcinom² verwendet.

2. Versuchsanordnung (siehe auch Abb. 1 und Tab. 1)

Die 48 für den Hauptversuch vorgesehenen Ratten wurden in zwei Gruppen aufgegliedert: in eine Gruppe A mit 24 Tieren und in eine Gruppe B mit ebenfalls 24 Tieren. Den Tieren der Gruppe A wurde zunächst WALKER-Carcinom inokuliert, im Anschluß daran ein Transferrin-gekuppeltes Tumorzellfiltrat appliziert und nach dem 13. bis 14. Tag post inoculationem der herangewachsene WALKER-Tumor exstirpiert. Den Tieren der Gruppe B, die primär gleichartig wie die Ratten der Gruppe A behandelt wurden, wurde das inzwischen herangewachsene WALKER-Carcinom belassen.

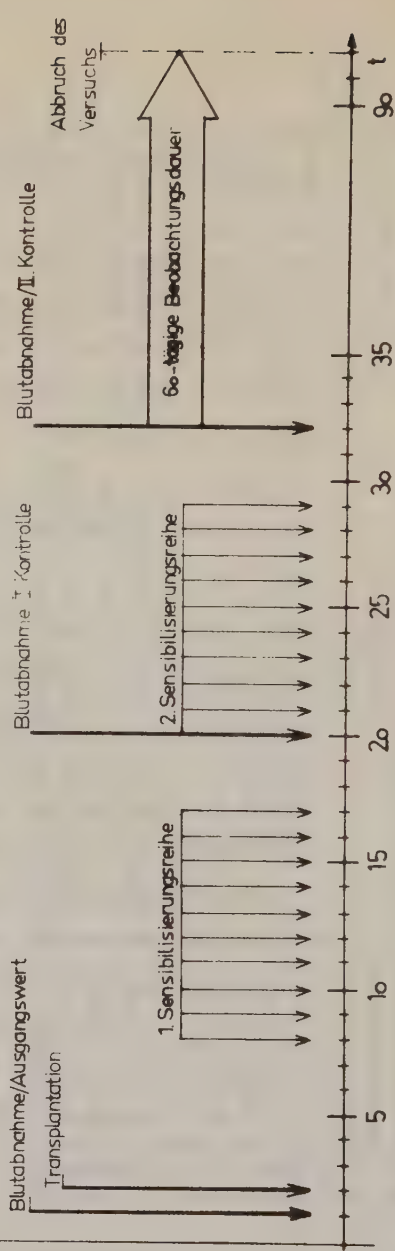
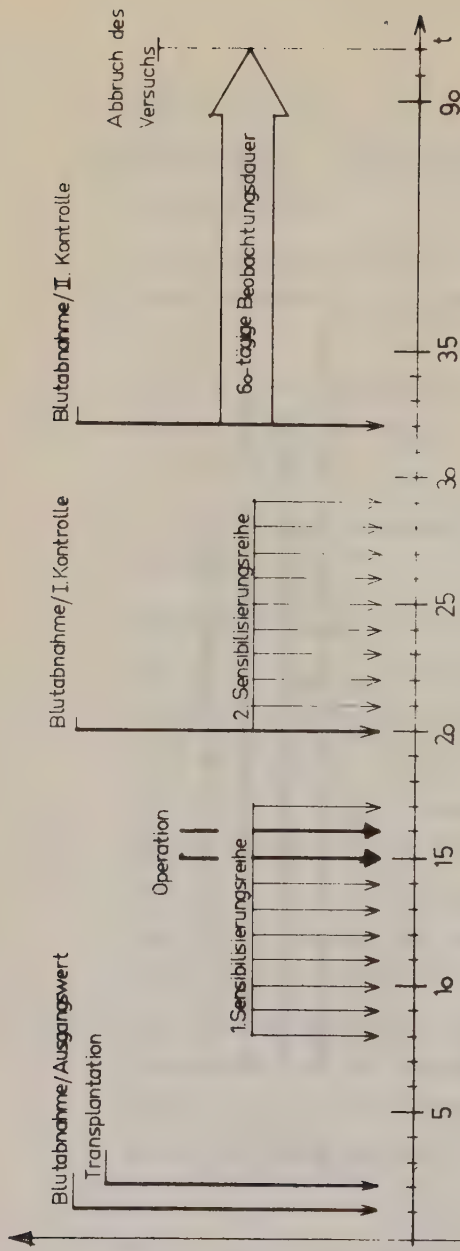
¹ Wistar-Ratten der Fa.KRAMER, Hannover.

² Tumortragende Ratten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Grundmann, Farbfabriken BAYER AG, Wuppertal-Elberfeld ^{*→} zur Verfügung gestellt. An dieser Stelle sei hierfür herzlich gedankt.

87											
n		Hauptversuchsgruppen		Kontrollgruppen					Nachversuch		
n		48		31					8		
Gruppe		A	B	C	D	E	F	G	H	I	K
n		24	24	6	5	5	5	5	5	4	4
Behandlung		TuTr Tu+Tf TuOp	TuTr Tu+Tf —	TuTr — TuOp	TuTr — —	TuTr Tf TuOp	TuTr Tf —	TuTr Tu TuOp	TuTr Tu —	MlzTu TuTr —	MlzN TuTr —

Tu = Tumorzellfiltrat
 TuTr = Tumortransplantation
 Tu+Tf = Komplex aus Tumorzellfiltrat und gekoppeltes Humantransferrin
 TuOp = operative Totalextirpation des inokulierten Tumors
 MlzTu = Milzcellfiltrat von tumortragenden Ratten der Gruppe A
 MlzN = Milzcellfiltrat nicht tumortragender Ratten

Tab.1



HVAO = Hauptversuchsanordnung

t = Zeit in Tagen

Abb. 1

Die Kontrolltiere wurden in insgesamt 6 Untergruppen, Gruppe C, D, E, F, G und Gruppe H eingeteilt. Die Aufgliederung im einzelnen ist der Tabelle 1 zu entnehmen (Tab. 1).

Generell wurde allen Ratten sowohl der Hauptversuchsgruppen als auch der Kontrollgruppen vor Behandlungsbeginn Blut entnommen. Danach erfolgte bei allen Tieren der Hauptversuchsgruppen A und B sowie der Kontrollgruppen C bis H die Übertragung des rattentransplantablen WALKER-Carcinoms. Nachdem die Tumorzellen angegangen waren, und das Carcinom sich bis zu Haselnußgröße entwickelt hatte, wurden in einer Sensibilisierungsserie von je 10 Tagen die Ratten der Hauptversuchsgruppen mit einem - unter Verwendung der BDB-Technik - Humantransferrin-gekuppelten Tumorzellfiltrat täglich injiziert. Durchschnittlich nach dem 13. bis 14. Tag post inoculationem wurden die Tumoren bei den 24 Tieren der Hauptversuchsgruppe A, wie oben bereits dargelegt, in toto exstirpiert. Nach einem behandlungsfreien Intervall von 2 Tagen wurde allen Ratten, ausschließlich der Kontrolltiere, Blut entnommen (1. Kontrolle). Danach schloß sich bei den Tieren der Hauptversuchsgruppe A eine erneute Sensibilisierungsreihe mit dem Humantransferrin-gekuppelten Tumorzellfiltrat an.

Den 24 Ratten der Hauptversuchsgruppe B wurde der Tumor belassen. Im übrigen gestaltete sich jedoch die Versuchsserie in gleicher Weise wie in Gruppe A.

Sämtliche Tiere wurden bis zu 13 Wochen von Versuchsbeginn ab, d.h. seit Tumorinokulation, beobachtet.

Die in Tabelle 1 dargelegten Versuchsmaßnahmen unter den Kontrollreihen wurden im Prinzip nach Art der Behandlung der Hauptversuchsgruppen vorgenommen. Dies bezieht sich auf die qualitativen und quantitativen Größen der Tumorzellfiltrate sowie der Humantransferrin-gekuppelten Tumorzellsuspensionen, ebenso wie auf die zeitlichen Verläufe.

Die für den Nachversuch vorgesehenen 8 Ratten wurden folgendermaßen behandelt: 4 unbehandelten Tieren wurde Zellsuspension der Milzorgane von tumortragenden Ratten appliziert, die gleichzeitig mit dem Tumorzell-Humantransferrin-Komplex behandelt worden waren. Nach einem Intervall von 12 Std. wurden WALKER-Carcinom-Zellen inokuliert. 4 weiteren Ratten wurde Milzzellsuspension völlig unbehandelter Tiere appliziert, und anschließend nach gleichem Intervall von 12 Std. WALKER-Carcinom übertragen.

Die Schlußkontrollen des Blutes der Ratten aus den Versuchsgruppen A bis H (2. Kontrolle für Gruppen A und B bzw. 1. Kontrolle für Gruppen C bis H) sowie die makroskopische Beurteilung der Tumorlokalisation bzw. der Residualtumoren und des Peritumoralgewebes - sofern noch einsehbar - wurden entweder kurz ante finem oder mit Ende der festgesetzten Beobachtungszeit vorgenommen. Sowohl die Tiere, die während der

Beobachtung eingingen, als auch die den Versuch überlebenden Ratten wurden am Ende der Beobachtungszeit eröffnet und deren Organe Milz, Leber und Tumoren makroskopisch sowie histologisch untersucht.

3. Methodik:

a) Blutentnahme.

Die einzelnen Tiere wurden kurzzeitig in einer eigens dafür präparierten Glasglocke narkotisiert. Die Blutentnahme erfolgte dadurch, daß ein Stück des Schwanzes gekappt wurde, und man ca. 1 ml Blut in ein steriles Reagenzglas tropfen ließ. Das Blut wurde bei Zimmertemperatur belassen und anschließend 5 min bei 2500 upm zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde sorgfältig abpipettiert und mit einem bakteriziden Mittel (Merfen) versetzt. Verwendet wurden nur lipämie- und hämolysefreie Sera.

b) Technik der Cellulose-Acetat-Folien-Elektrophorese.

Zur Analyse der Serum-Eiweißkörper wurde die CAF-Elektrophorese nach den Angaben von Kohn (46, 47), hier unter Verwendung der Elektrophoresekammer der Fa. Bender und Hobein³, sowie der von der gleichen Firma gelieferten Cellulose-Acetat-Folien⁴ (CAF) vorgegangen. Eine CA-Folie wurde gleichmäßig mit Pufferlösung angefeuchtet und auf die Brücke

^{3,4} Fa. Dr. BENDER & Dr. HOBEIN, München

einer Elektrophorese-Kammer gespannt, so daß beide Enden in die Pufferlösung ($\text{pH} = 8,6$; Ionenstärke $\mu = 0,05$) der Kammer tauchten. Anschließend wurden von dem zu untersuchenden Serum mit einer Pipette jeweils 0,008 ml auf eine Folie aufgetragen. Bei einer Gleichstromspannung von 220 V liefen die Elektrophoresen zwischen 1 1/4 und 2 Stunden. Sodann wurden die einzelnen Fraktionen mit Amidoschwarz 10 B gefärbt. Die Streifen wurden auf Objektträger aufgezogen, kurzfristig in ein Transparenzbad eingelegt und anschließend bei einer Temperatur von ca. 105°C im Trockenschrank fixiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss-Photometer und Integralschreiber⁵.

c) Gewinnung des Tumorzellfiltrats.

Zur Gewinnung des Tumorzellfiltrats wurden Walker-Tumor-tragende Ratten verwendet. Der Tumor wurde unter möglichst sterilen Bedingungen freigelegt, aus seiner bindegewebigen Kapsel gehoben und grob mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde die Tumormasse durch eine Embryonenpresse genutscht und im Verhältnis 1:4 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Verwendet wurde nur nekrosefreier Tumor.

⁵ Fa. ZEISS, Oberkochen

d) Gewinnung des Tumorhomogenats.

Für die Nachweisreaktion auf spezifische Tumorantikörper gegen Walker-Carcinom wurde nekrosefreies Tumorgewebe wie folgt aufbereitet: Der Tumor wurde, wie oben bereits erwähnt, vollständig entfernt, zerkleinert, im Verhältnis 1:4 mit physiologischer NaCl-Lösung versetzt und mit dem Ultraturrax-Stab⁶ mehrfach 1 sec lang bei 20 000 upm homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit dem Ultraschall-Desintegrator weiterbehandelt und daraufhin bei 15 000 upm 30 min bei +4° C zentrifugiert.⁷ Der Überstand wurde abpipettiert und auf einen Eiweißgehalt von 0,5 g % eingestellt.

e) Kupplung der Tumorzellen an Transferrin (BDB-Technik).

Prinzip: Bei der BDB-Technik [Technik unter Verwendung bisdiazotierten Benzidins (68)] werden mittels einer chemischen Bindung antigene Substanzen an die Oberfläche von Erythrocyten - resp. Tumorzellen - gekuppelt. Die so behandelten Erythrocyten - resp. Tumorzellen - zeigen nach Zugabe eines Immunsarums Agglutination.

Material

1. Tumorzellfiltrat 2,5 %ig

⁶ Fa. JANKE u. KUNKEL KG, Staufen i. Br.

⁷ Fa. CHRIST, Osterode/Harz

2. Benzidinreagenz: 0,23 g Benzidin p.a. werden in 45 ml 0,2n HCL gelöst. 0,1765 g Na NO₂ p.a. werden in 5 ml Aqua dest. gelöst. Die salzsaure Benzidinlösung und die Natriumnitritlösung werden zusammengegossen und 30 min bei 0° C aufbewahrt. Das gebrauchsfertige Reagenz kann eingefroren und in der Tiefkühltruhe⁸ über längere Zeit aufbewahrt werden.

3. Sörensen-Puffer:

0,15 m Na₂HPO₄ + 0,15 m KH₂PO₄ ph 7,4

4. Antigen: Humantransferrin⁹

Ausführung: Das Tumorzellfiltrat wird in der gleichen Weise vorbereitet, wie für die Agglutinationstechnik nach Boyden beschrieben wurde. Die optimale Antigenkonzentration bei der Agglutination des Zellfiltrats für die BDB-Technik hängt von dem Verhältnis der Proteinkonzentration zu der Konzentration des Benzidinreagenzes sowie von der Art des verwendeten Antigens ab. Bei der Herstellung wird wie folgt vorgegangen: die Tumorzellen werden 3 x mit 0,95% NaCl (Verhältnis 1:3) gewaschen (upm = 2500; t = 7 min). Nach Abpipettieren der überstehenden Flüssigkeit wird das Sediment zusammen mit Sörensen-Puffer zu einer 2,5%igen Tumorsuspension verarbeitet.

⁸ Fabrikat BBC

⁹ Fa. BEHRINGWERKE, Marburg/Lahn

Von dieser Lösung werden 5 ml mit 200 mg Transferrin-Pulver versetzt. Die Lösung wird mit Benzidinreagenz, das vorher im Verhältnis 1:15 mit Sörensen-Puffer verdünnt wurde, auf 50 ml aufgefüllt. Nachdem die Suspension kräftig gemischt wurde, wird sie 10 min bei Zimmertemperatur belassen. Danach wird sie 2 x 5 min bei 1500 upm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Sediment in 350 ml Sörensen-Puffer resuspendiert. Das mit Antigen beladene Zellfiltrat wird mit 3,5 ml (entsprechend einer 1%igen Lösung) inaktiviertem Kaninchenserum zusammengebracht, von dem zur Ermittlung des Titers eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Die Ablesung erfolgt wie bei der Boyden-Technik beschrieben.

Die Kontrollversuche sind die gleichen wie die bei der Boyden-Technik angegebenen.

Das fertige BDB-gekoppelte Tumorzell-Transferrin-Substrat wurde vor Anwendung für den Hauptversuch auf einem Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet, in Methylalkohol in der Kälte fixiert und nach erneutem Lufttrocknen mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Humantransferrin überschichtet. Anschließend wurde es 30 min inkubiert (37° C) und nach Spülen mit physiol. Kochsalzlösung unter dem Fluoreszenzmikroskop¹⁰ be-

urteilt.

f) Gewinnung von Milzzellfiltrat.

Die Milzorgane behandelter sowie nicht behandelter Ratten wurden von Bindegewebe und Fett freipräpariert, in physiol. NaCl-Lösung mehrfach gespült, zerkleinert und schließlich unter Hinzufügen einiger Milliliter physiol. Kochsalzlösung durch die Embryonenpresse getrieben. Das so erhaltene Milzzellfiltrat wurde im Verhältnis 1:4 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt.

g) Transplantationstechnik.

Von einem tumortragenden Tier wurde nach Tötung im Ätherrausch das maligne Transplantat in toto entnommen und sorgfältig von peritumoralem und tumorfremdem Bindegewebe gesäubert. Nekrotische Tumoren wurden nicht verwendet. Die exstirpierten Tumoren wurden zerkleinert und sodann durch die Embryonenpresse getrieben. Es wurde steril gearbeitet. Das so gewonnene Zellfiltrat wurde im Verhältnis 1:4 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und ebenfalls unter Wahrung steriler Kautelen dem Tier subcutan seitlich injiziert. Im allgemeinen wurden 0,5 ml pro Inokulationsstelle und Tier appliziert.

h) Operationstechnik bei Tumorexstirpation. (Abb. 2a-d)

Die Operation erfolgte in Äthernarkose. Nach dem Ausspannen der Ratte auf einer Metallplatte



Abb. 2a) Narkose: Darstellung
des Operationsfeldes.

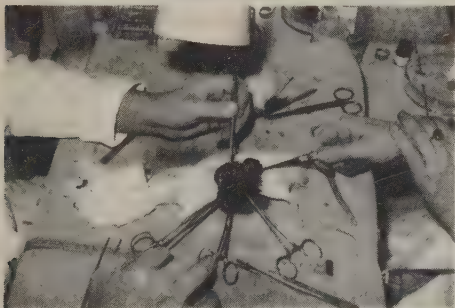


Abb. 2b) Teilpraeparation: Darstel-
lung des Tumors.

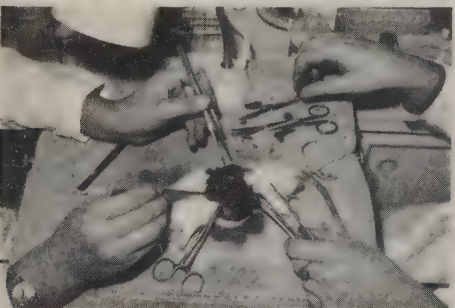


Abb. 2c) Totalexspiration des
freipraeparierten Tumors.



Abb. 2d) Verschuß der Operations-
wunde durch Einzelnähte.

Abb. 2a - d : Verschiedene Phasen der Tumorexstirpation
eines Versuchstieres.

wurde im Bereich des Tumors das Fell rasiert und die Haut jodiert. Es wurde ein Hautschnitt in Anpassung an die Ausdehnung des Tumors geführt und anschließend stumpf weiterpräpariert. Der Tumor wurde freigelegt und in toto exstirpiert (Abb. 2a-d). Bis auf einige Ausnahmen ließen sich die Tumoren ohne weiteres aus ihrer bindegewebigen Kapsel herauslösen. Es folgten Fasziennähte, sodann die Hautnaht. Zur Vermeidung von Infektionen wurde Vibramycin (Fa. PFIZER) verwendet. Sämtliche Tiere überlebten den Eingriff.

i) Sensibilisierungsplan.

Bei sämtlichen Ratten außer den Kontrolltieren wurden zwei Sensibilisierungsreihen von je 10 Tagen Dauer vorgenommen. Der Beginn der ersten Sensibilisierungsserie erfolgte, nachdem die Tumoren Haselnußgröße erreicht hatten - durchschnittlich am 6. Tag post transplantationem. Es wurden jedem Tier täglich 0,5 ml des Tumorzellfiltrat-Transferrin-Komplexes subcutan appliziert. Danach schloß sich ein behandlungsfreies Intervall von 2 Tagen an. Es folgte die zweite Sensibilisierungsreihe (vgl. Schema Abb.1).

k) Zweidimensionale Immundoppeldiffusion im Agargel nach Ouchterlony (60).

Im Prinzip handelt es sich hier um die von verschiedenen Positionen aus in verschiedener

Richtung bzw. konzentrisch erfolgende Diffusion von Antigen- und Antikörperlösung in ein neutrales (gemeint ist hier ein immunologisches "neutrales", d.h. weder mit Immunsérum noch mit Antigen gemischtes Medium) festes Medium, wobei an den Berührungsstellen von Antigen und Antikörper ein spezifisches, unlösliches Immunpräzipitat entsteht.

Für die Praxis hat sich folgende Technik als geeignet erwiesen:

Material und Reagenzien:

1. Objektträger
2. Agar-Agar (gepufferter 1 - 1,2 %iger Agar)
3. Phosphat-Puffer pH 7,1 (0,15 M) :

Lösung I: 26,70 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml
Aqua dest.

Lösung II: 20,41 g KH_2PO_4 ad 1000 ml
Aqua dest.

67 ml der Lösung I werden ad 100 ml mit

Lösung II gemischt.

4. Antigenlösung: Anti-Humantransferrin.
5. Antikörperlösung: Rattensérum.

Wenn das Präparat im Original aufbewahrt werden soll, so ist Trocknen des Agars und Färben der Präzipitationslinien mit einem Proteinfarbstoff erforderlich. Hierzu sind folgende Reagenzien vorzubereiten:

6. Filtrierpapier
7. Färbelösung und Entfärber:

0,5 g Amidoschwarz 10B werden in 100 ml einer Lösung aus 9 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig gelöst.

Der Entfärber besteht lediglich in dem Gemisch aus 9 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig.

Laborgeräte und Apparate:

1. Feuchte Kammer
2. Trockenschrank¹¹
3. Photokopier- oder Photographier-Einrichtung-

Arbeitsgänge:

1. Aufbereiten des gepufferten Agars. 100 ml obigen Puffers (pH 7,1; 0,15 m) werden mit 300 ml Aqua dest. und Zusatz eines Konservierungsmittels (z.B. 4%iges Merfen) gemischt. In einem Weithals-Erlenmeyer-Kolben werden 1 g bis 1,2 g Agarpulvers eingewogen und mit 100 ml der mit Aqua dest. gemischten Pufferlösung versetzt, auf Asbest über der Bunsenflamme auf 100°C erhitzt, bis eine klare, zumeist leicht gelblich gefärbte Lösung gebildet ist. Diese wird durch ein Nylonfilter genutscht und unverzüglich zum Gießen der Objektträger verwendet.
2. Gießen der Agarschicht und Ansetzen der für den Analysensatz vorgesehenen Lösungen. Die Objektträger werden fett- und staubfrei auf einer exakt waagrechten Unterlage - am besten mit schwarzem

¹¹ Fa. HERAEUS, Hanau

Anstrich - so vorbereitet, daß sie völlig frei aufliegen, d.h. nicht aneinanderstoßen.

Sie werden sodann mit 2,5 ml der aufbereiteten, heißen Agarlösung beschickt. Nach dem Erstarren des gepufferten Agarmediums werden im Abstand von je 7 mm (Mittelpunkt zu Mittelpunkt) runde Aussparungen mit einem Durchmesser von 3 mm gestantzt (hierzu kann z.B. der Schaft einer Kugelschreibermine verwendet werden) und mit einer Nadel oder Kanüle herausgehoben. Die Versuchsanordnung für die Aufnahme von Antigen- und Antikörperlösung kann dabei beliebig gewählt werden. Für die semiquantitative Beurteilung von Antigenen eignet sich die Rosettenanordnung (20).

3. Ausbildung der Präzipitate. Nach Einfüllen von Antigen- und Antikörperlösung (randvoll) werden die Objektträger in eine feuchte Kammer eingebracht. Es ist dabei zu beachten, daß die Lösungen vor dem Bewegen in den Agar eingedrungen sein sollen ; und weiterhin, daß auch die feuchte Kammer waagrecht stehen muß. Das einfachste Prinzip der feuchten Kammer ist die Petri-Schale (bedeckt), in der grundsätzlich der Vorgang der zweidimensionalen Immundoppeldiffusion vor sich gehen kann, wenn man nicht die Objektträger-Anordnung vorzieht.

Die Ausbildung der Präzipitationslinien kann

beschleunigt werden, wenn man die feuchte Kammer bei einer Temperatur von 37° C hält. Sie ist dann im allgemeinen nach 12 Stunden abgeschlossen.

Bei Raumtemperatur ist eine Zeitdauer von 24 Stunden zu veranschlagen, um ein optimales Präzipitationsergebnis zu erhalten.

4. Dokumentation. Im allgemeinen genügt die Feststellung der Beobachtung von Zahl, Intensität und Form bzw. Position der ausgebildeten Präzipitationslinien. Das Ergebnis kann aber ohne weiteres im Kontaktverfahren durch Unterlegen eines unbelichteten Photopapiers (Schichtseite unter die Glasseite des mit Agar beschickten Objektträgers), Belichten und Entwickeln festgehalten werden. Das gleiche ist möglich durch Photographie der Präzipitationslinien im Agar-gel im durchscheinenden Licht gegen schwarzen Untergrund unter Ausnutzung des Tyndall-Effekts. Schließlich können die Objektträger gefärbt und als solche in einem Präparatekasten aufbewahrt werden.
5. Färben mit Amidoschwarz 10B. Dem Färbevorgang geht das Wässern in physiol. NaCl- bzw. 1%iger NaCl-Lösung voraus, sowie das Trocknen der Agarschicht unter Filtrierpapier bei 37 bis 40° C. Danach Lösen des Filtrierpapiers vom

Agarfilm, der nunmehr mit dem Objektträgerglas fest verhaftet ist. Der Färbe- und Entfärbevorgang ist denkbar einfach: 5 bis 10 min. Färben in oben angegebener Färbelösung. Entfärben, d.h. Herauslösen der überschüssigen Färbelösung aus dem Agargrund, durch mehrmaliges Einlegen der Objektträger in frischen Entfärber; jeweils etwa 10 min. Trocknen bei Raumtemperatur.

L. Histologische Präparationen.

Die Anfertigung histologischer Präparate, deren Färbung und Beurteilung verdanke ich Herrn Prof. Dr. E. Müller, vormals Direktor des Pathologischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg.

C. Ergebnisse:

1. Beobachtungen an den Tieren (vgl. Abb. 1, Tab. 1, 2):

Gruppe A (Abb. 3a, b):

In der Gruppe der Tiere, die transplantiert und mit dem Tumorzell-Humantransferrin-Komplex sensibilisiert worden waren, und welche nach 13 bis 14 Tagen der bis dahin gewachsenen Tumoren operativ weitgehend befreit wurden, überlebten 22 Tiere. Eine Ratte starb während der Narkose, während das andere Tier wegen intraperitonealer Metastasierung inoperabel war. Von diesen 22 verbliebenen Versuchsratten wurde in 5% ein Rezidiv beobachtet. Bei den anderen Tieren (= 95%) ließ sich eine völlige Remission nachweisen (Abb. 3a, b). Die Tiere zeigten ein gutes Allgemeinbefinden und eine Überlebensdauer von 90 Tagen nach erfolgter Transplantation. Zu diesem Zeitpunkt nach Versuchsbeginn wurde die Beobachtung abgebrochen. Die Ratten zeigten keine Rezidive. Sie verhielten sich praktisch wie unbehandelte Tiere. (Tab.2). Bei der oben erwähnten Ausnahme eines Versuchstieres mit Rezidiv wurde eine weitere Sensibilisierungsserie mit dem Tumorzell-Humantransferrin-Komplex über 10 Tage hinweg angeschlossen. In diesem Zeitraum entwickelte sich der Resttumor von ca. Pflaumenkerngröße - nach einem zunächst erfolgten Wachstumsstillstand - völlig zurück, so daß er makroskopisch

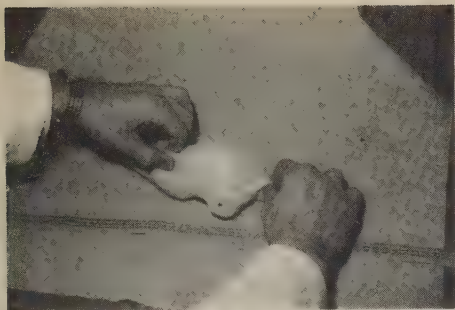


Abb. 3 a:

Gruppe A: Tumor-Wachstum nach Transplantation.



Abb. 3 b:

Gruppe A: Gleiches Tier wie Abb.3a
6 Wochen n. Tumorentfernung.

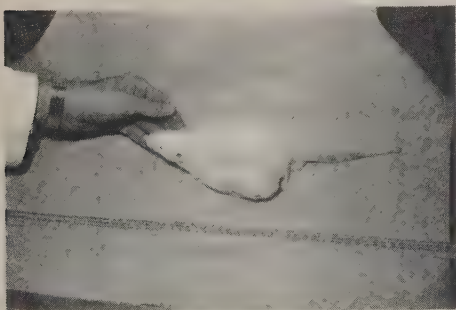


Abb. 4 a:

Gruppe B: Anfängliches Tumorwachstum

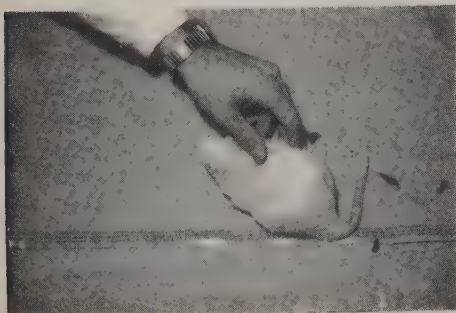
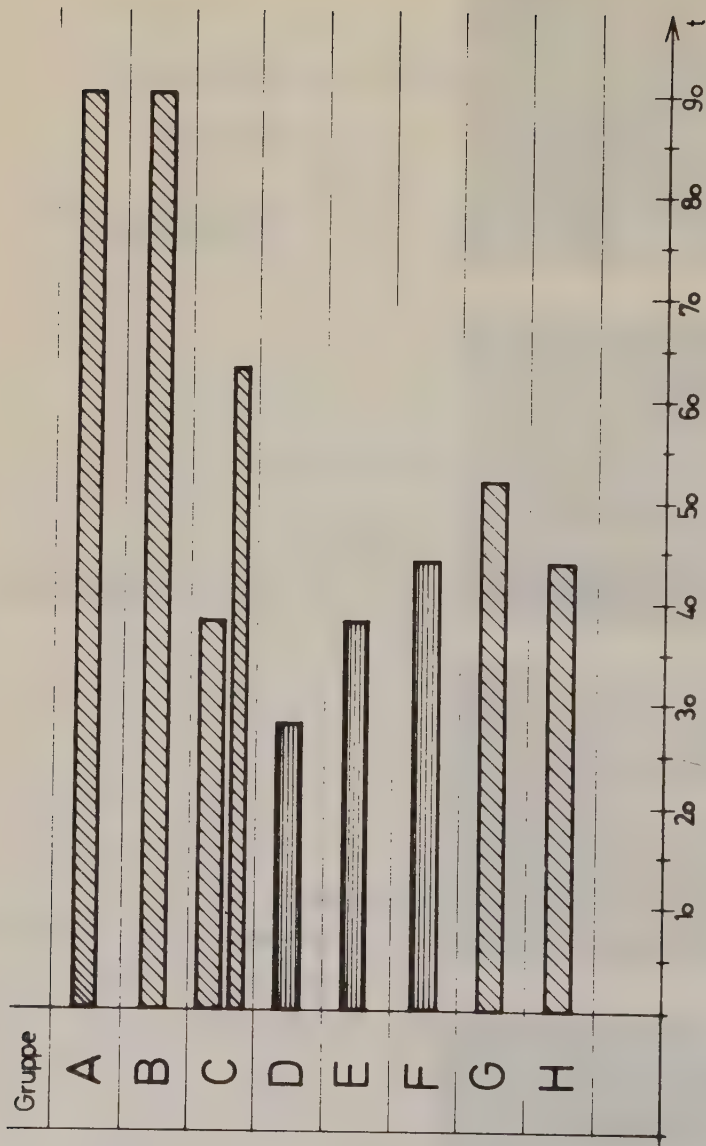


Abb. 4 b:

Gruppe B: Gleiches Tier wie Abb.4a
ca. 5 Wochen später.



Tab. 2 Durchschnittliche Überlebensdauer der Versuchstiere
nach erfolgter Tumortransplantation

nicht mehr fassbar war. Das Tier überlebte bis zuletzt.

Gruppe B (Abb. 4a, b):

In der Gruppe der Ratten, die Walker-Zellen transplantiert bekamen, ferner sensibilisiert wurden, deren Tumor über den Zeitraum der gesamten Beobachtung hinweg jedoch belassen wurde, konnte in 35% eine partielle Rückbildung der Tumoren, in 65% eine vollständige Remission festgestellt werden. Auch hier konnten keine Rezidive wahrgenommen werden (Abb. 4a, b, Tab. 2).

Gruppe C:

Bei den Kontrolltieren, die Tumorzellfiltrat inokuliert bekamen, zeigte sich durchweg ein erstes Angehen zwischen dem 4. und 6. Tag post transplantationem. Nach Entfernung des Tumors kam es nach durchschnittlich 10 Tagen bei 4 Tieren zu einem Rezidiv, das sich von da an bis zu Pflaumengröße kontinuierlich weiterentwickelte und nach weiteren 12 - 18 Tagen zum Exitus führte. Bei 2 Tieren entwickelte sich erst nach 18 Tagen ein Rezidiv, das von da an über einen Zeitraum von weiteren 32 Tagen ebenfalls zum Exitus der Tiere führte (Tab. 2).

Gruppe D:

Bei den Tieren der Gruppe D, die lediglich Tumorzellfiltrat inokuliert bekamen, zeigte sich durchwegs ein Angehen zwischen dem 4. und 6. Tag post transplantationem und von da an ein kontinuierliches Tumorstadium. Die meisten Tiere gingen an Tumorkachexie, im Mittel nach 28 Tagen, zugrunde (Tab. 2).

Gruppe E und G:

Die Tiere der Gruppen E und G verhielten sich im Prinzip wie die der Gruppe C. Die Gruppe G zeigte im Unterschied zur Gruppe E ein größeres Intervall bis zur ersten Rezidiventstehung, d.h. 21 - 26 Tage (Tab. 2).

Bei einem Tier kam es unter der Behandlung mit Tumorzellfiltrat zur Entwicklung zusätzlicher Tumoren. Die Tiere überlebten mit dieser Ausnahme insgesamt um durchschnittlich 14 Tage länger als die der Gruppe E und C.

Gruppe F und H:

Die Ratten dieser Gruppen verhielten sich im wesentlichen wie die der Gruppe D - nur mit dem Unterschied, daß das Wachstum der Tumoren weniger intensiv vor sich ging als bei den Tieren der Gruppe D. Die Überlebenschance betrug im Mittel 44 Tage (Tab. 2).

Gruppe I und K (Nachversuch):

Bei den 4 Ratten, welche Milzzellsuspensionen von Tieren aus der Hauptversuchsgruppe A 12 Stunden vor einer Tumordinokulation appliziert bekamen, wurde in keinem Fall ein Angehen der Walker-Carcinom-Zellen wahrgenommen.

Dagegen zeigten jene 4 Tiere, welche mit den Milzzellen normaler, nicht in Versuch stehender Ratten vorbehandelt worden waren, nach Applikation von Tumorzellsuspension nach 4 bis 7 Tagen makroskopisch faßbare Tumorentwicklung.

2. Befunde der Cellulose-Acetat-Folien-Elektrophorese:

Die statistisch ermittelten Ausgangswerte (Relativ-Prozente) der einzelnen Gruppen sind in den entsprechenden Tabellen wiedergegeben (Tab. 3a; 4a; 5a, b, c, d, e, f). Die Statistik wurde weiterhin angewandt auf die Berechnung der Mittelwerte von 1. und 2. Kontrolluntersuchung der Hauptversuchsgruppen A und B, ferner zur Ermittlung von Signifikanzen zwischen Ausgangswerten und den Werten der 1. Kontrolle, weiterhin zwischen den Befunden der 1. und der letzten Kontrolle sowie schließlich zwischen den Mittelwerten des Ausgangs und denjenigen der Endkontrolle.

Darüber hinaus wurden von allen Kontrollgruppen neben den Ausgangswerten auch die Endwerte stati-

Tab. 3a

Ausgangswerte/n=24						
	Alb.	Globuline				
		α_1	α_2	α_3	β	γ
$M = \frac{\sum x}{n}$	40,49	15,41	7,28	5,52	19,21	12,06
σ	9,81	2,50	2,02	3,29	2,94	3,24

Tab. 3b

1. Kontrolle/n= 22						
	Alb.	Globuline				
		α_1	α_2	α_3	β	γ
$M = \frac{\sum x}{n}$	39,38	12,33	7,59	7,94	18,27	14,50
σ	5,28	2,31	1,52	1,62	2,31	3,04

Tab. 3c

2. Kontrolle = Endwerte/n=22						
	Alb.	Globuline				
		α_1	α_2	α_3	β	γ
$M = \frac{\sum x}{n}$	34,77	13,51	8,91	8,20	18,55	16,04
σ	7,43	2,47	2,26	2,39	3,16	2,15

Verhalten der Kontrollen ist nicht verschieden von Gruppe A
Streuweite ist ähnlich.

Signifikant erhöhte Werte, jeweils im Vergleich zur Voruntersuchung, bei Enikontrolle im Vergleich zum Ausgangswert

Signifikant erniedrigte Werte wie oben

Tab. 4a

Ausgangswerte n=24						
	Alb.	Globuline				
		α_1	α_2	α_3	β	γ
$M = \frac{\sum x}{n}$	39,73	15,47	6,54	4,50	20,43	13,32
σ	6,17	3,39	1,77	1,15	2,58	2,48

Tab. 4b

1. Kontrolle n=24						
	Alb	Globuline				
		α_1	α_2	α_3	β	γ
$M = \frac{\sum x}{n}$	38,71	13,38	7,85	6,80	19,56	13,70
σ	4,81	2,66	1,29	1,47	2,59	2,32

Tab. 4c

2. Kontrolle = Endwerte n=24						
	Alb.	Globuline				
		α_1	α_2	α_3	β	γ
$M = \frac{\sum x}{n}$	38,21	12,77	7,48	7,58	18,75	15,22
σ	5,60	2,25	1,53	1,50	2,37	3,21

w. Tab. 4a, 4b, 4c

Tab. 4a, 4b, 4c: Endwerte

Tab. 5d

Kontrollgruppe F / n=5							
		Alb	Globuline				
			α_1	α_2	α_3	β	γ
Endwert-Ausg. te	M	46,33	17,36	5,87	3,59	15,28	11,55
	σ	8,54	4,04	0,41	0,82	4,39	5,41
	M	29,91	15,39	11,38	11,15	21,04	11,13
	σ	2,12	1,81	1,33	1,01	3,00	4,04

Tab. 5e

Kontrollgruppe G / n = 5							
		Alb	Globuline				
			α_1	α_2	α_3	β	γ
Endwert-Ausg. te	M	40,89	15,11	7,28	4,14	20,36	12,23
	σ	14,8	0,61	0,85	0,31	1,44	0,80
	M	29,27	16,22	9,89	11,36	21,82	11,44
	σ	2,54	1,21	1,39	1,69	2,79	1,28

Tab. 5f

Kontrollgruppe H / n=5							
		Alb	Globuline				
			α_1	α_2	α_3	β	γ
Endwert-Ausg. te	M	41,52	15,15	7,67	3,85	19,64	12,17
	σ	4,84	1,63	0,60	0,63	1,06	2,94
	M	29,00	15,52	10,12	11,05	23,86	10,44
	σ	1,83	1,02	0,59	1,50	3,42	1,76

Wie Tab. 5a - 5c: σ = Standardabweichung

stisch ausgewertet und zur Beurteilung von signifikanten Unterschieden einander gegenübergestellt.

Die Befunde dieser Berechnungen sind in den Tabellen 3a - c, 4a - c, 5a - f dargelegt. Signifikante Unterschiede sind dadurch gekennzeichnet, daß die entsprechenden Werte stark umrandet wurden.

Die Befunde der elektrophoretischen Serumproteinanalysen zeigten in Gruppe A (operierte Tiere) bei erster Kontrolle vor allem eine Zunahme der α_3 -Globuline, bei zweiter Kontrolle eine Hypalbuminämie mit Vermehrung der α_3 - und insbesondere der γ -Globulinfraktionen.

In Gruppe B zeigten sich gleichartige Serumproteinverhältnisse, mit dem Unterschied, daß hier bei der Endkontrolle die γ -Globulinämie nicht so deutlich ausgeprägt war und außerdem, daß eine in Gruppe A bei erster Kontrolle nachweisbare Reduzierung der α_1 -Globuline hier erst bei letzter Untersuchung deutlich wurde.

Die Befunde der Kontrollgruppen C bis H ließen durchweg eine tiefgreifende Dysproteinämie mit Hypalbuminämie, Vermehrung der α_2 -, α_3 - und vielfach auch der β -Globuline erkennen. Die γ -Globulinfraktion erwies sich dagegen bei Endkontrolle im Vergleich zu den Ausgangswerten entweder als quantitativ unverändert oder als vermindert. In Einzel-

fällen kam es sogar zu einer regelrechten Hypo- oder Agammaglobulinämie.

3. Befunde der zweidimensionalen Immun-Doppeldiffusion im Agargel:

Die Technik wurde in vorliegender Arbeit ausschließlich zum Nachweis bzw. Ausschluß von molekularen Antikörpern gegen Humantransferrin, das als Kupplungsprotein an Tumorzellmembranen verwandt wurde, eingesetzt. Somit wurden lediglich die Serumproben der Tiere aus den Gruppen A, B, E und F untersucht. Die Befunde sind in Tabelle 6 summarisch wiedergegeben.

Insgesamt konnte - erwartungsgemäß - festgestellt werden, daß alle mit Humantransferrin behandelten Ratten mit erster Kontrolle Antikörper gegen dieses menschliche Plasmaprotein gebildet hatten. Dabei zeigten die Kontrolltiere aus den Gruppen E und F relativ höhere Titerstufen als die der Hauptversuchsgruppen A und B.

Bei zweiter und letzter Kontrolle waren die Antikörperkonzentrationen aller Gruppen, gemessen an den Titerstufen, abgesunken, in den Gruppen E und F relativ steil, in den Gruppen A und B vielfach nur gering, d.h. etwa um eine Titerstufe.

Gruppe	A		B	E	F	Bemerkungen
	pos/ neg	Titer				
A	n	24	—	—	—	
		20	—	—	—	
I.K.	n	22	0	0	0	
		1:8 bis 1:64	1:4 bis 1:32	1:4 bis 1:128	1:32 bis 1:256	E+F isoliertes Transferin
II.K. ante finem	n	22	20	5	5	
		1:4 bis 1:32	1:4 bis 1:16	1:4 bis 1:32	1:8 bis 1:32	

Tab.6

Befunde des zweidimensionalen Immun-Doppeldiffusionstests (OUCHTERLONY) unter Verwendung von Rattenserum und Anti-Humantransferrin.

Angabe sind die Bereiche zwischen den untersten und obersten Verdünnungsstufen.

A: Ausgangswerte

I.K.: Werte der 1. Kontrolle

II.K.: Werte der 2. Kontrolle

n : Anzahl der Tiere

4. Histomorphologische Befunde:

Befunde an Tumoren unbehandelter Ratten sowie diejenigen Befunde, die sich zum Zeitpunkt ad finem der Tiere aus Gruppe A objektivieren ließen, sind in den Abbildungen 5, 6a und 6b wiedergegeben.

Der auffälligste Befund bestand in einer zirkulär angeordneten, dichten Infiltration kleinzelliger Lymphozyten mit vorwiegend kompaktem Kern. Dazwischen und in Nähe der Tumorzellen fanden sich Immunzellen, die plasmatisch stärker aufgelockert waren und einen relativ grösseren Kern besaßen. Dieses Phänomen zeigte sich in reichlichem Maße vor allem im Peritumoralgebiet der Tiere aus Gruppe A sowie an Residualtumoren bei Ratten der Gruppe B.

Demgegenüber konnte um die Nekrosebezirke von Walker-Carcinom der meisten Tiere aus den Kontrollgruppen im wesentlichen eine intensive polymorphkernige Leukozyteninfiltration, vielfach mit Makrophagen und Eosinophilen, sowie vereinzelt mit Plasmazellen festgestellt werden.

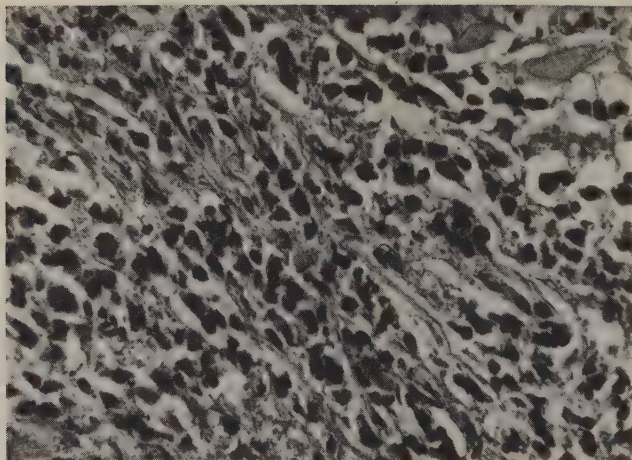


Abb. 5: Mikrophotografische Darstellung (Vergr.ca.128x)
eines HE-gefärbten Schnittes (ca. 4 μ Dicke)
aus Walker-Carcinom einer unbehandelten Ratte
aus Gruppe D.

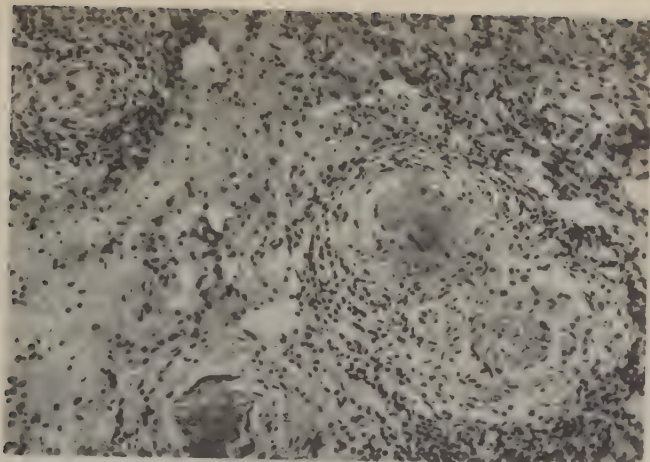


Abb. 6a:

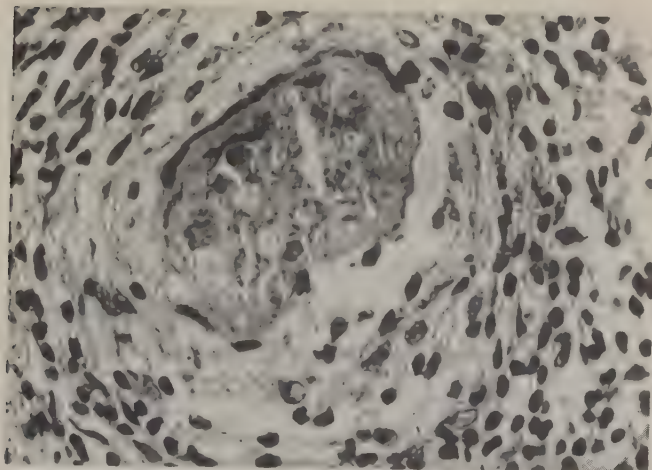


Abb. 6b:

Abb. 6a, b: Mikrophotografische Darstellung (Abb. 6a ca. 128x)
des Residualbezirkes eines inokulierten Walker-
Carcinoms nach Behandlung mit Tumor-Humantrans-
ferrinkomplex, Gruppe B:

Vorwiegend zirkulär angeordnete kleinzellige
Lymphozyten-Infiltration um Tumorherde mit zentra-
len Nekrosen.

Bei Abb. 6b vergrößerter Ausschnitt (Vergr.ca.480x)

D) Diskussion

Die vorliegenden Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß ein inokulierter Tumor, der bei Ratten ohne jegliche Behandlung ungehindert heranwächst und den Wirtsorganismus zugrunde richtet, unter der Behandlung mit individualeigenem, BDB gekuppeltem Tu-Tf-Komplex allmählich in seinem Wachstum gehemmt und schließlich reduziert, ja sogar zum völligen Schwund gebracht werden kann. Die Zeitdauer bis zur vollständigen Remission wird verkürzt, wenn den so behandelten Tieren der Tumor operativ entfernt wurde. Nur Transferrin behandelte Ratten sowie lediglich mit Tumorzellfiltrat behandelte Tiere verhielten sich im wesentlichen wie unbehandelte, tumortragende Ratten, wenn man davon absieht, daß sie durchschnittlich 16 Tage länger am Leben blieben als diese. Dasselbe gilt mit unterschiedlich langen Überlebenszeiten nach Tumordinokulation für die übrigen Kontrollgruppen. Der Operationseffekt erwies sich in jedem Falle retardierend auf den malignen Prozess.

Die Remission der Tumoren in den beiden Hauptversuchsreihen darf als Ausdruck einer spezifischen Transplantatabstoßungsreaktion gewertet werden, da die Tumorentwicklung oder -übertragung eine durch Transplantationsantigene

induzierte immunologische Reaktionslage des Wirtsorganismus hervorruft: Mit der Inokulation von Walker-Zellfiltrat⁶ wurde bei den Ratten ein Antigenreiz gesetzt - allerdings mit schwachen TST-Antigenen -, der zu einer spezifischen zellulären Immunantwort, d.h. zur Ausreifung clonal sensibilisierter Lymphozyten geführt hat. Diese Antikörperbildung nahm eine bestimmte Zeit in Anspruch, bis eine höhere Konzentration entsprechender Immunzellen gebildet war. In diesem Zeitraum aber konnte sich das Tumorstadium mit dem Erfolg einer Vervielfältigung des antigenen Materials ungehindert weiterentwickeln. Aus diesem Grund - wie auch aus der Tatsache, daß infolge der schwachen Antigene eine nur mäßige Antikörperbildung induziert wurde - ergibt sich eine Diskrepanz zwischen Antigen- und Antikörperangebot zu Ungunsten der Abwehrintensität. Das ist zugleich der Grund für eine scheinbare Toleranz des Rattenorganismus mit Bezug auf den transplantierten Tumor. Aus der experimentellen Tumorummunologie sind wiederum analoge Versuche bekannt geworden, in welchen Tumorzelltransplantate mit reichlich Zellmaterial offenbar die immunologischen Abwehrmechanismen ungenügend informieren, was wiederum dahingehend zu interpretieren ist,

daß diese mengenmäßig "großen" Transplantate durch ihr unkontrolliertes Wachstum von vornherein einen nicht mehr aufholbaren Antigenüberschuß mit sich bringen. Somit stellt die Auseinandersetzung eines tumortragenden Organismus mit seiner Neoplasie ein Teilproblem der Immuntoleranz dar.

Mit Bezug auf die heutigen Vorstellungen über das Wesen der Immuntoleranz darf in Sonderheit für die Tumorummunologie folgendes angenommen werden: neoplastische Zellen werden, ungeachtet ihrer Entstehungsursache, von einem tumortragenden Organismus in der Regel als "fremd" bzw. nicht als "self" registriert. Wiewohl Tumorantigene nach heutigem Wissen im Vergleich zu den H-Antigenen einen Verlust dieser Oberflächenfaktoren aufweisen, scheinen sie dennoch tumorspezifische Neoantigene entwickelt zu haben, die als "fremd" zu werten sind. Daneben existieren auch im Zytoplasma und Zellkern der Tumorzelle antigene Faktoren, die jedoch für die typischen Transplantationsreaktionen eine untergeordnete Bedeutung haben. Die exakten Kenntnisse über diese H- und Plasmaantigene von Tumorzellen sind, wenn man von Beispielen aus der experimentellen Tumorforschung absieht, derzeit noch unbefriedigend. Die Vorstellungen beruhen auf Analog-

schlüssen aus der experimentellen Tumorummuno-
logie sowie aus einzelnen klinischen Erfahrungsa-
tatsachen.

Unter der Applikation von Komplexen, die mit
Hilfe des BDB-Verfahrens durch Kupplung von
Tumorzellfiltrat mit einem Heteroantigen in of-
fensichtlich ausreichender Menge - wie fluoreszenz -
optische Ausstrichpräparate bewiesen haben - her-
gestellt wurden, wurden in vorliegender Versuchs-
anordnung wahrscheinlich die clonal durch den
eigenen Tumor vorsensibilisierten Lymphozyten
mit Anti-Tumor-Eigenschaft im Sinne der "Auf-
frischimpfung" aktiv stimuliert. Möglicherweise
kam es bei einzelnen Tieren vorübergehend zu
einem Enhancement-Phänomen, das darauf beruht,
daß eine Immunisierung mit tumorspezifischen
Antigenen das Heranwachsen bereits transplantiert-
er, gleichartiger Tumorzellen zu soliden Neoplas-
men zu fördern vermag. Dieses Enhancement-Phänomen
beruht auf der Konkurrenz von humoralen und zell-
gebundenen Antikörpern, wobei humorale Antikör-
per die tumorspezifischen H-Antigene blockieren
und damit deren aktive Antigenität, die offenbar
zur Unterhaltung der immunologischen Reaktions-
lage dauerhaft erforderlich ist, zu inhibieren
vermögen. Das gelingt im allgemeinen nur dann,
wenn molekulare Antikörper, die prinzipiell bei

jeder Transplantationsreaktion neben den zellulär vermittelten Antikörpern nachweisbar sind, im Überschuß vorliegen; und auch nur dann, wenn Tumorzellen gegenüber den zytotoxischen Antikörpern resistent sind. Es scheint jedoch, daß in der Versuchsreihe B (ohne Operation) der verzögerte Rückgang des Tumorwachstums entweder unter dem Einfluß der weiteren Sensibilisierung oder durch die allmählich entfaltete maximale Booster-Wirkung mit Bezug auf die zellulären Antikörper überwunden wurde und zu einer successiven Remission geführt hat. In der Versuchsreihe A (mit Operation) wurde offenbar durch die Entfernung des antigenen Materials durch die Operation der Primärtumoren eine Entfernung der im Überschuß vorhandenen Antigene erzielt; und in den Fällen, in welchen die Operation nur partiell möglich war - infolge starker Infiltration - wurde das antigene Material so reduziert und in den Äquivalenzbereich einer erfolgreichen AG-AK-Reaktion verlegt, daß hier offenbar eine ideale Transplantationsreaktion ablaufen konnte. Dies wird insbesondere durch die histomorphologischen Befunde bewiesen; außerdem damit, daß mit einer Ausnahme sämtliche Tiere dieser Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 90 Tagen rezidivfrei blieben. Ein

weiterer Beweis für diese Vorgänge ist die Tatsache, daß Milzzellfiltrate der so behandelten Tiere bei gesunden Ratten ein Angehen neuer Inokulate verhindern. Die Feststellung, daß die Tiere der Gruppen A und B sämtlich über den Beobachtungszeitraum von 90 Tagen rezidivfrei blieben, kann darüber hinaus weiterhin als Beweis gelten.

Somit legen die vorliegenden experimentellen Untersuchungen nahe, daß die Reduzierung des Tumormaterials bei Neoplasien für das weitere günstige Schicksal eines tumortragenden Organismus die entscheidende Therapie ist. Dabei ist der operativen Entfernung und einer immunologischen, spezifisch clonalen Nachbehandlung die größte Bedeutung beizumessen, da jegliche konventionellen Therapieversuche mit intensive Zytostase respektive Röntgenbestrahlung mit dem erheblichen Nachteil einer schweren Beeinträchtigung des immunologisch kompetenten Zellsystems belastet sind.

E) Zusammenfassung:

=====

In vorliegender Arbeit wurde an insgesamt 87 Albinoratten der Versuch gemacht, nach Inokulation von Walker-Carcinom-Zellen durch Applikation eines veränderten Tumorzellfiltrats die autologe Transplantatabstoßungsreaktion zu aktivieren.

Als Kombinat zu dem gewählten Walker-Carcinom wurde ein Xeno-Antigen, Humantransferrin, gewählt, das unter Verwendung der BDB-Technik an Tumorzellen gekuppelt wurde. In mit angesetzten Kontrollgruppen wurden reines Tumorzellfiltrat, isoliertes Humantransferrin mit- untersucht; desgleichen wurden lediglich mit Tumorzellfiltrat behandelte Tiere beobachtet. Unter den Hauptversuchsgruppen wurde in soweit in 2 Gruppen differenziert, als eine durch Operation des primär gesetzten Tumors, die andere ohne einen solchen Eingriff der Behandlung mit Tumor-Humantransferrin-Komplex unterzogen wurde.

Als Ergebnis konnte festgestellt werden, daß in den Hauptversuchsgruppen A und B in einem Prozentsatz von 98 v.H. eine wochenlange Remission faßbar wurde. Dabei erwiesen sich die Befunde und der Allgemeinzustand der operierten Tiere als relativ besser als die der nicht

operierten; wiewohl auch sie ein hervorragendes Therapieergebnis aufwiesen.

Die Kontrolltiere sämtlicher Untergruppen verhielten sich praktisch wie unbehandelte, tumortragende Ratten. Sie gingen sämtlich in einem Zeitraum von 28 bis maximal 63 Tagen an Tumorkachexie zugrunde.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse weisen darauf hin, daß es offensichtlich gelingt, maligne Tumoren durch Autosensibilisierung in ihrem Wachstum zu hemmen. Dabei scheint lediglich die Alteration der malignen Tumorzellen Bedeutung zu erlangen. Das Modell könnte auch für therapeutische Maßnahmen in der Humanpathologie geeignet sein.

Literaturverzeichnis

- 1) ANDREWS, G. A., C. C. Congdon, C. L. Edwards,
N. Gengozian, B. Nelson and H. Vodopick:
Preliminary trials of clinical immuno-therapy.
Cancer Res. 27 (1967) 2535.
- 2) APFFELS, C. A., B. G. Arnason and I. H. Peters:
Induction of tumor immunity with tumor cells
treated with iodoacetate.
Nature (London) 209 (1966) 694.
- 3) BALDWIN, R. W.:
An immunological approach to cancer.
Lavori Ist. Anat. Univ. Perugia 28 (1968) 65.
- 4) BJÖRKLUND, B. and V. Björklund:
Antigenicity of pooled human malignant and
normal tissues by cyto-immunological technique,
presence of an insoluble, heat-labile tumor
antigen.
Internat. Arch. Allergy 10 (1957) 153.
- 5) BJÖRKLUND, B. and I. E. Paulsson:
Studies of hemagglutination as a means for
assay of malignant and normal human tissue
antigens.
J. Immunol (Baltimore) 89 (1962) 759.
- 6) BJÖRKLUND, B., I. B. Graham and R. M. Graham:
Effect of horse anti-human cancer serum on
malignant and normal human cells, preliminary
report.
Internat. Arch. Allergy 10 (1957) 56.
- 7) BOYDEN, S. V.:
Cytophilic antibody. In: Cellbound antibodies.
Philadelphia: Wistar Institute Press (1963).

- 8) BOYSE, E. A., L. J. Old and H. Oettgen:
Tumor immunology.
Textbook of immunopathology (Miescher P.A.
and J. H. Mueller-Eberhard).
Grune & Stratton, Vol. II. 1969.
- 9) BOYSE, E. A., L. J. Old and E. Stockert:
The TL (thymus leukemia) antigen:
A review IV th International Symposium for
Immunopathology (New York) 23 (1965).
- 10) BURNET, F. M.:
Immunological factors in the process of carcinogenesis.
Brit. med. Bull. 20 (1964) 154.
- 11) BURROWS, D.:
Schultz-Dale test for detection of specific
antigen in sera of patients with carcinoma.
Brit. med. J. (1958 I) 368.
- 12) BURROWS, D. and D. W. Neill:
Investigation of the immunologically active
constituent of serum of patients with carcinoma.
Brit. med. J. (1958 I) 370.
- 13) BURTIN, P., S. von Kleist, W. Rapp, F. Loisillier,
A. Bonatti et P. Grabar:
Autoanticorps chez les cancéreux.
Presse méd. 73 (1965) 2599.
- 14) DEICHMANN, G. I. and T. E. Klucharewa:
Immunological determinants of oncogenesis in
hamsters infected with SV 40 - virus.
Virology 24 (1964) 131.
- 15) EDDY, B. E., G. E. Grubbs and R. D. Young:
Tumor immunity in hamsters, infected with
adenovirus type 12 or simian virus 40.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 117 (1964) 575.

- 16) FINK, M. A. and R. A. Malmgren:
Fluorescent antibody studies of the viral
antigen in an murine leukemia (Rauscher).
J. nat. Cancer Inst. 31 (1963) 1111.
- 17) FOLEY, E. J.:
Immunity of C3H mice of lymphosarcoma 6C3HED
following regression of the transplanted tumor.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80 (1952) 131.
- 18) FOLEY, E. J.
Attempts to induce immunity against mammary
adenocarcinoma in inbred mice.
Cancer Res. 13 (1953) 578.
- 19) FOLEY, E. J.
Antigenic properties of methylcholanthrene-in-
duced tumors in mice of the strain of origin.
Cancer Res. 13 (1953) 835.
- 20) GABL, F.:
Laboratoriumsblätter, Behringwerke Nr. 2 (1967) 47.
- 21) GALLMEIER, W. M. und H. F. Oettgen:
Tumorimmunologie.
Dtsch. med. Wschr. 93 (1968) 1114.
- 22) GÖTZ, H.:
Antigenität von Tumorproteinen.
Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York 1972.
- 23) GÖTZ, H.:
Prophylaktische und therapeutische Konsequenzen
aus den Erkenntnissen der modernen Tumorimmunologie.
Protectio vitae 1 (1971) 13.
- 24) GÖTZ, H. und D. Goller:
Immunologische Vorgänge an tumortragenden Organismen.
Münch. med. Wschr. 112 (1970) 2203.

- 25) GÖTZ, H., F. Scheiffarth und H. Krieger:
Präzipitierende Antikörper in Seren von Patienten
mit malignen Erkrankungen des Verdauungstraktes
(zum Druck vorbereitet).
- 26) GOLD, P. and S. O. Freedman:
Specific cracinoembryonic antigens of the
human digestive system.
J. Exp. med. 122 (1965) 467.
- 27) GOLDNER, H., A. J. Girardi, V. M. Larson and
M. R. Hilleman:
Interruption of SV-40 virus tumorigenesis
using irradiated homologous tumor antigen.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 117 (1964) 851.
- 28) GORER, P. A.:
Some recent work on tumor immunity.
Adv. Cancer Research 4 (1956) 149.
- 29) GRABAR, P.:
Embr/yonie constituents in tumors and antibodies
in cancerous patients.
Microbiology 44 (1968) 86.
- 30) GRACE, J. T., jr. and T. Kondo:
Investigations of host resistance in cancer
patients.
Ann. Surg. 148 (1958) 633.
- 31) GRACE, J. T., jr., E. A. Mirand and D. T. Mount:
Relationship of viruses to malignant desade.
Part II. Oncogenic properties of cellfree
filtrates of human tumors.
Arch. Intern. Med., 105 (1960 b) 482.

- 32) GRACE, J. T., jr.:
Clinical aspects of immunity in untreated cancer.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 114 (1964) 736.
- 33) GROSS, L.:
Importance of dosage in intradermal immunization against transplantable neoplasma.
Cancer Res. 3 (1943) 770.
- 34) GROSS, L.:
Specificity of acquired tumor immunity.
J. Immunol. 50 (1945) 91.
- 35) HABEL, K.:
Resistance of polyoma virus immune animals to transplanted polyoma tumors.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 106 (1961) 722.
- 36) HABEL, K.:
Immunological determinants of polyoma virus oncogenesis.
J. Exp. Med. 115 (1962) 181.
- 37) HABEL, K.:
Specific. CF antigens in polyoma tumors and transformed cells.
Virology 25 (1965) 55.
- 38) HELLSTRÖM, I., K. E. Hellström, G. Pierce and J. P. S. Yang:
Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasmas.
Nature 220 (1968) 1352.
- 39) HELLSTRÖM, I., and H. O. Sjögren:
Demonstration of H-2 isoantigens and polyoma specific tumor antigens by measuring colony formation in vitro.
Exp. Cell. Res. 40 (1965) 212.

- 40) HUEBNER, R. J., W. P. Rowe, H. C. Turner and
W. T. Lane:
Specific adeno-virus complement-fixing antigens
in virus-free hamster and rat tumors.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash) 50 (1963) 379.
- 41) HUEBNER, R. J., D. Armstrong, M. Okuyan, P. S. Sarma
and H. C. Turner:
Specific complement-fixing viral antigens in
hamster and guinea pig tumors induced by the
Schmidt-Ruppin strain of avian sarcoma.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash) 51 (1964) 742.
- 42) KLEIN, E. and G. Klein:
Antigenic properties of lymphomas induced by
the Moloney agent.
J. nat. Cancer Inst. 32 (1964) 547.
- 43) KLEIN, G. and E. Klein:
Antigenic properties of other experimental tumors.
Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 27 (1962) 463.
- 44) KLEIN, G., H. O. Sjögren, E. Klein and K. E. Hellström:
Demonstration of resistance against methylcholanthrene
induced sarcomas in the primary autochthonous host.
Cancer Res. 20 (1960) 1561.
- 45) KLEIST, S. von and P. Burtin:
On the specificity of autoantibodies present in
colon cancer patients.
Immunology 10 (1966) 507.
- 46) KOHN, J.:
A new supporting medium for zone electrophoresis.
Biochem. J. 65 (1957) 9.
- 47) KOHN, J.:
Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese.
Ärztl. Labor 10 (1964) 233.

- 48) LEJNEVA, O. M., L. A. Zilber and E. S. Ievleva:
Humoral antibodies to methylcholanthrene
sarcomata detected by a fluorescent technique.
Nature 206 (1965) 1163.
- 49) MATHÉ, G., L. Schwarzenberg, J. L. Amiel, M. Schneider,
A. Cattani and J. R. Schlumberger:
The immunological approach to the treatment
of human cancer.
Europ. J. Cancer 3 (1967) 423.
- 50) MÖLLER, G.:
Effects on tumor growth in syngeneic recipients
of antibodies against tumorspecific antigens
in methylcholanthrene induced mouse sarcomas.
Nature 204 (1964) 864.
- 51) MOORE, D. H., and M. J. Lyons:
Electrophoretic separation of the mouse
mammary tumor virus.
J. Nat. Cancer Inst 31 (1963) 807.
- 52) NADLER, S. H., and G. E. Moore:
Clinical immunologic study of malignant disease.
Response to tumor transplants and transfer of
leukocytes.
Ann. Surg. 164 (1966) 482.
- 53) OETTGEN, H. F., E. A. Boyse and L. J. Old.
Krebs und Immunologie.
Krebsforschung und Krebsbekämpfung 6 (1967) 49.
- 54) OETTGEN, H. F. and W. M. Gallmeier:
Tumorimmunologie
Dtsch. med. Wschr. 93 (1968) 1072

- 55) OETTGEN, H. F. and W. M. Gallmeier:
Immunology in tumors. Tests on humans.
Minerva Med. 60 (1969) 984.
- 56) OETTGEN, H. F. and W. M. Gallmeier:
Tumorimmunologie (Erf. am Menschen)
Dtsch. med. Wschr. 93 (1968) 1157.
- 57) OLD, L. J., E. A. Boyse and F. Lilly:
Formation of cytotoxic antibody against
leukemias induced by Friend virus.
Cancer Res. 23 (1963) 1063.
- 58) OLD, L. J., E. A. Boyse and E. Stockert:
The G (Gross) leukemia antigen.
Cancer Res. 25 (1965) 813.
- 59) OLD, L. J. E. A. Boyse, D. A. Clarke and
E. A. Carswell:
Antigenic properties of chemically induced
tumors.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 101 (1962) 80.
- 60) OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion - in - gel methods for immunological
analysis.
Progr. Allergy, 5, 1-78 (Krager, Basel, New York
1958).
- 61) POPOE, J. H. and W. P. Rowe:
Detection of specific antigen in SV-40
transformed cells by immunofluorescence.
J. exp. Med. 120 (1964) 121.
- 62) PREHN, R. T. and J. M. Main:
Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.
J. Nat. Cancer Inst. 18 (1957) 769.

- 63) RAPP, F., S. J. Butel and J. L. Melnick:
Virus intranuclear antigen in cells trans-
formed by papovavirus SV-40.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 116 (1964) 1131.
- 64) ROBINSON, E., N. Ben-Hur and H. Zuckermann:
Further immunologic studies in patients
with choriocarcinoma and hydatiform mole.
Cancer Res. 27 (1967) 1202.
- 65) SABIN, A. B. and M. A. Koch:
Behaviour of noninfectious SV-40 viral
genome in hamster tumor cells; induction
of synthesis of infectious virus.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash) 50 (1963) 407.
- 66) SOLOWEY, A. C. and F. T. Rapaport:
Immunologic responses in cancer patients.
Surg. Gynec. Obstet. 121 (1965) 756.
- 67) SOUTHAM, C. M.:
The immunologic status of patients with
nonlymphomatous cancer.
Cancer Res. 28 (1968) 1433.
- 68) SOUTHAM, C. M.:
Evidence of immunological reactions to
autochthonous cancer in man.
Europ. J. Cancer 1 (1965) 173.
- 69) WEIR, D. M. (Editor):
Handbook of Experimental Immunology.
Blackwell Scientific Publications
Oxford and Edinburgh 1967.

Herrn Prof. Dr. med. Scheiffarth möchte ich für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Übernahme des Referats herzlich danken.

Mein Dank gilt darüber hinaus Frau Prof. Dr. med. H. Götz, derzeit am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Immunchemie, die mich jederzeit großzügig und hilfsbereit bei meiner Arbeit unterstützte.

L e b e n s l a u f

=====

Geboren wurde ich am 21. November 1946 in Leipzig als Sohn des Bauamtmanns i.R. Wilhelm Käfer und seiner Ehefrau Anita, geb. Senf.

Im Juli 1953 folgte ich mit meiner Mutter und meinen beiden Schwestern meinem Vater im Zuge der Familienzusammenführung nach Nürnberg nach, wo ich 4 Jahre bis 1957 die Volksschule besuchte. Von 1957 bis zum Abitur im Juli 1966 war ich Schüler des damaligen Realgymnasiums (heute Willstätter-Gymnasium).

Im November 1966 wurde ich als Medizinstudent an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen-Nürnberg immatrikuliert. Nach 2 Semestern bestand ich 1967 das Vorphysikum, nach weiteren 3 vorklinischen Semestern im März 1969 das Physikum, im Juli 1972 bestand ich die ärztliche Prüfung ebenfalls in Erlangen.

Im Oktober 1972 wurde ich als Medizinalassistent am Stadt- und Kreiskrankenhaus in Ansbach tätig, wo ich auch nach Erhalt meiner Approbation im Oktober 1973 als Vollassistent in der Chirurgie bis Januar 1974 weiterarbeitete.

Seitdem leiste ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Ansbach, im März 1974

Gundolf Käfer

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990